

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 32320141153432

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

真核翻译起始因子3调控能量代谢相关蛋白
的合成

eIF3 Regulate Translation Control Of Metabolic Energy

苏丹

指导教师姓名: 徐阳 讲师

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2017年5月

论文答辩时间: 2017年5月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 曾骥孟

评阅人: __

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ Dieter
wolf ）课题（组）的研究成果，获得（ Dieter
wolf ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ Dieter
wolf ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	11
缩略词.....	13
1 前言	14
1.1 概述 mRNA 的翻译过程和 eIF3 在翻译过程中的作用	14
1.1.1 翻译起始.....	15
1.1.2 翻译延伸.....	17
1.1.3 翻译终止.....	18
1.1.4 核糖体循环.....	18
1.1.5 eIF3 和 癌症的关系.....	18
1.2 eIF3e 与癌症的关系	19
1.2.1 eIF3e 的发现.....	19
1.2.2 eIF3e 在乳腺癌中的作用.....	19
1.2.3 eIF3e 在其他人类癌症中的作用.....	20
1.3 eIF3e 在 fission yeast <i>S pombe</i> 的作用	21
1.3.1 缺乏 eIF3e 和 d 的裂殖酵母在翻译起始上有缺陷.....	22
1.3.2 eIF3 缺乏导致糖酵解切换, 氧化应激和寿命缩短.....	24
1.4 eIF3e 在人类细胞中的特异性功能	28
1.4.1 eIF3e 促进线粒体蛋白的表达.....	28
1.4.2 eIF3e 可能与线粒体基因的 5' UTR 序列相互作用.....	30
1.5 研究意义	30
2 实验方法	32
2.1 细胞培养	32
2.2 Western blot	32
2.2.1 准备蛋白样品.....	32
2.2.2 跑 SDS-PAGE 胶和转膜.....	32
2.2.3 封闭和抗体孵育.....	32
2.2.4 显影.....	33
2.3 siRNA 和质粒转染	33
2.4 纯化总 RNA	33
2.5 逆转录	34
2.6 RNA 免疫共沉淀 和荧光定量 PCR	34
2.6.1 准备蛋白样品 (HeLa 细胞)	34
2.6.2 抗体和蛋白孵育.....	35
2.6.3 Beads 和抗体-蛋白复合物孵育.....	35
2.6.4 移除 beads 上的非特异性结合.....	35
2.6.5 分离 RNA.....	35
2.6.6 逆转录和荧光定量 PCR.....	36
2.7 快速扩增 cDNA 的 5' 端 (5' RACE)	36

2.7.1 设计基因特异性引物.....	36
2.7.2 制备 RACE-ready cDNA.....	37
2.7.3 快速扩增 cDNA ends.....	38
2.7.4 辨别目的片段和测序.....	38
2.8 在质粒里去除或者插入某片段.....	39
2.8.1 原理图.....	39
2.8.2 设计引物.....	40
2.8.3 操作.....	40
2.9 体外转录.....	41
2.9.1 流程.....	41
2.9.2 操作.....	41
2.10 体内翻译系统.....	42
2.11 体外翻译系统.....	42
2.11.1 准备细胞.....	42
2.11.2 裂解细胞.....	43
2.11.3 准备体外翻译反应体系.....	43
2.12 实验常用缓冲液.....	44
3 实验结果.....	46
3.1 在人乳腺细胞中 eIF3e 促进线粒体蛋白尤其是 ETC 蛋白的表达.....	46
3.2 下调 eIF3e 的表达不会影响 ETC 的 mRNA 水平.....	48
3.3 eIF3 能直接与线粒体蛋白的 mRNA 相互作用.....	49
3.4 MCF7 细胞中线粒体基因的 5' UTR 序列.....	51
3.4.1 eIF3e 可以调控线粒体基因的 5' UTR 序列.....	51
3.4.2 用 5' RACE 的方法找到的 MCF7 细胞中线粒体基因的 5' UTR 序列.....	53
3.4.3 被选择的线粒体基因的 5' UTR 序列.....	55
3.5 体内翻译实验表明 eIF3e 可以促进融合了线粒体基因 5' UTR 序列的荧光素酶质粒表达.....	56
3.6 体内翻译实验表明 eIF3e 可以促进融合了线粒体基因 5' UTR 序列的荧光素酶 mRNA 翻译成蛋白.....	58
3.6.1 体外转录.....	58
3.6.2 利用 HeLa 细胞提取物体外翻译 mRNA.....	59
4 讨论.....	61
4.1 eIF3 复合物调控能量代谢相关蛋白的翻译过程.....	61
4.2 eIF3e 通过与其 5' UTR 序列相互作用特异性调控线粒体 mRNA 的翻译.....	62
4.3 eIF3e 可以作为治疗癌症的新靶点.....	64
4.4 展望.....	65
5 结论.....	66
6 参考文献.....	66
致谢.....	71

Table of contents

Abstract	9
Abbreviations	13
1 Introduction	14
1.1 Overview of mRNA translation and role of eIF3	14
1.1.1 Translation initiation.....	15
1.1.2 Translation elongation.....	17
1.1.3 Translation termination.....	18
1.1.4 Recycling.....	18
1.1.5 eIF3 and cancer.....	18
1.2 The role of eIF3e in cancer	19
1.2.1 Discovery of eIF3e.....	19
1.2.2 Role of eIF3e in breast carcinomas.....	19
1.2.3 Role of eIF3e in other human cancer.....	20
1.3 The role of eIF3e in fission yeast <i>S pombe</i>	21
1.3.1 Cells deleted for eIF3 subunits e and d are deficient in initiation of translation.....	22
1.3.2 eIF3 deficiency leads to glycolytic switch, oxidative stress and reduced lifespan.....	24
1.4 The role of eIF3e in energy metabolism	28
1.4.1 eIF3e promotes mitochondrial protein expression.....	28
1.4.2 eIF3e may interact with 5'UTR of Mitochondrial genes.....	30
1.5 Significance	30
2 Methods	32
2.1 Cell culture	32
2.2 Western blot	32
2.2.1 Sample preparation.....	32
2.2.2 SDS-PAGE electrophoresis and transfer.....	32
2.2.3 Block and antibody incubation.....	32
2.2.4 Development(visualization).....	33
2.3 siRNA and Plasmid transfection	33
2.4 Total RNA purification	33
2.5 RT-PCR	34
2.6 RNA-IP and Q-PCR	34
2.6.1 prepare cell lysate (Hela cell)	34
2.6.2 Incubate antibody and cell lysate.....	35
2.6.3 Incubate with Beads.....	35
2.6.4 Wash beads.....	35

2.6.5 Isolate RNA.....	35
2.6.6 RT-PCR and q-PCR.....	36
2.7 5'RACE.....	36
2.7.1 Design special primers.....	36
2.7.2 Prepare RACE-ready cDNA.....	37
2.7.3 Amplification cDNA ends.....	38
2.7.4 Seperate expected DNA fragment and Sequence.....	38
2.8 Modify plasmid.....	39
2.8.1 Seperate expected DNA fragment and Sequence.....	39
2.8.2 Design the primers.....	40
2.8.3 Methods.....	40
2.9 In vitro transcription.....	41
2.9.1 Work flow.....	41
2.9.2 Methods.....	41
2.10 In vivo translation.....	42
2.11 In vitro translation.....	42
2.11.1 Prepare cell material.....	42
2.11.2 Cell lysis.....	43
2.11.3 Prepare in vitro translation reaction.....	43
2.12 Commonly used buffer.....	44
3 Results.....	46
3.1 eIF3e promotes the synthesis of electron transport proteins in human breast cells.....	46
3.2 Lacking eIF3e unaffacts mRNA levels.....	48
3.3 eIF3 can interact with the mRNA of mitochondrial protein.....	49
3.4 5'UTR Sequence of Mitochondrial genes in MCF7 cells.....	51
3.4.1 The role of eIF3e in full length 5'UTR of Mito genes.....	51
3.4.2 Find all kinds of splice 5'UTR sequence by 5'RACE methods in MCF7 cells.....	53
3.4.3 Choose the short 5'UTR Sequence.....	55
3.5 In vivo translation system shows the eIF3e promotes 5'UTR-fused Nano-luciferase reopoter plasmid expression.....	56
3.6 In vitro translation system shows the eIF3e promotes Nano-luciferase mRNA fused 5'UTR of mitochondrial genes translation.....	58
3.6.1 Prepare mRNA for In vitro transcription.....	58
3.6.2 In vitro translation using Hela cell extract.....	59
4 Discussion.....	61
4.1 eIF3 complex mediates global translational control of energy metabolism.....	61
4.2 eIF3e specially regulates mRNA of Mitochondrial genes by interacting with their 5'UTR.....	62
4.3 eIF3e may offer a novel target of cancer therapy.....	64
4.4 Future directions.....	65

5 Conclusion	66
6 Reference	66
Acknowledgement	71

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

eIF3 is the largest and most complex initiation factor, comprising of 13 subunits. we have found that eIF3e and d lacking in *S. pombe* specifically decreases the production of mitochondrial proteins, particularly electron transport chain (ETC) proteins. Not all eIF3 subunits are essential for protein synthesis and cell survival, suggesting that some have mRNA selective function in translation. Using a series of proteomic approaches to quantitatively profile protein synthesis, we have found that subunits eIF3e and d constitute a module that specifically promotes the production of mitochondrial proteins, in particular electron transport chain (ETC) proteins. With the re-emerging focus on the essential role of the mitochondrial ETC in cell proliferation, cancer stem cell maintenance, and drug resistance, it is conceivable that the ETC promoting function of eIF3 discovered in our studies underlies, at least in part, its tumor promoting activity. In this model, eIF3 would be limiting for mitochondrially produced energy and building blocks which fuel cancer cell anabolism and thus represents an intriguing novel cancer drug target. Nevertheless, mechanistic insight into the mRNA selective functions of eIF3 remains scarce and no drugs exist to target the tumor promoting activity of eIF3. In summary, we would like to answer two questions: one is Which mRNAs are selectively regulated by eIF3 subunits? In order to address this question, we have been performing a series of global approaches to identify subunit-specific subsets of eIF3-regulated mRNAs. The techniques we have used include ribosome profiling, polysome profiling followed by RNA sequencing, RNA immunoprecipitation and sequencing (RIP-Seq) as well as pulsed SILAC-based proteomics. So far, these studies have confirmed that eIF3 regulates metabolic mRNAs. Another question is How do eIF3 subunits mediate mRNA selectivity? To address this question, we have set up an in vitro translation system to measure the activity of luciferase reporter genes fused to the 5'-UTRs of eIF3 sensitive mRNAs (especially mRNAs encoding mitochondrial proteins). This assay system will allow us to use mutagenesis and binding assays to identify mRNA

sequence motifs mediating eIF3-dependent control.

Key words: Eukaryotic translation initiation; Electron transport chain ; 5'UTR

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

eIF3 是真核翻译起始因子中分子量最大，组成最复杂的一类，同时也是研究最不充分的一个蛋白家族。eIF3 在人体细胞中由 13 个亚基组成，在裂殖酵母（fission yeast *S pombe*）中有 11 个亚基。课题组前期，在国际上首次发现 *s pombe* 细胞缺乏 eIF3e 和 eIF3b 会降低其线粒体蛋白的表达水平，尤其是线粒体中电子传递链(ETC)上的蛋白。不是所有的 eIF3 亚基都对蛋白合成和细胞生存是必须的，这预示其中一些亚基有可能选择性的调控某类 mRNA。运用蛋白质组学定量分析蛋白质合成的方法，我们发现 eIF3e 和 d 亚基构成了一个特别地模块，这个模块可以促进线粒体蛋白特别是 ETC 蛋白的生成。随着线粒体 ETC 蛋白在细胞增殖，癌症干细胞维持和肿瘤耐药性获得过程中的作用愈来愈突出，结合我们的研究中发现 eIF3 的 ETC 促进功能，我们推测 eIF3 可以促进肿瘤的形成和生长。在 eIF3e 和 eIF3d 缺失的癌细胞模型中，线粒体由于蛋白合成的缺陷不能产生能量，从而造成癌细胞合成代谢障碍，抑制癌细胞繁殖，提示 eIF3 可能作为新型癌症药物的治疗靶点。然而，eIF3 是如何选择性调控 mRNA 翻译的机制还不清楚。因此，本课题主要想回答两个问题：第一，什么样的 mRNA 可以被 eIF3 的亚基调控？为了解决这个问题，我们设计了一系列实验去确定哪个或者哪几个亚基调节哪一类或哪几类 mRNA。运用的实验技术包括核糖体和多核糖体分析结合 RNA 测序，RNA 免疫共沉淀结合 RNA 测序和 SLAC 标记的蛋白质定量分析组学等。本课题的实验结果证实 eIF3 的亚基(e 和 d 亚基)可以特异性地调节能量代谢相关的 mRNA。第二，eIF3 的亚基是如何特异性调控 mRNA 的？为了解决这个问题，我们建立了体外翻译系统去测量融合了代谢相关基因 5' UTR 序列的 nano 荧光素酶的活力。通过该系统，我们可以检测代谢相关基因的翻译是否会依赖 eIF3 的亚基，并找到与 eIF3 亚基相互作用的 mRNA 序列区域。通过对 eIF3e 在人类细胞尤其是人乳腺癌细胞中的研究，我们暂且得出以下结论：1) eIF3e 缺失会使细胞线粒体呼吸链特别是 ETC 蛋白表达水平降低，最终表现为线粒体呼吸链功能异常，氧化磷酸化供能减少；2) eIF3e 并不调控所有蛋白的表达，而是特异性地调控线粒体尤其是 ETC 蛋白的表达；3) eIF3e 选择性调控线粒体蛋白表达的方式，很有可能是通过调控其 mRNA 的 5'UTR 区域实现的，并且与 5'UTR 序列的长短有关，但是具

体的机制尚不清楚；4) 在我们的研究中，eIF3e 是作为一种抑癌因子存在的，可以成为新的治疗癌症的药物靶点。

关键词：真核翻译起始因子；电子传递链；5' 端非转译区

厦门大学博硕士论文摘要库

Abbreviations

eIF	eukaryotic Initiation Factor	真核翻译起始因子
eIF3e		真核翻译起始因子 3 的 e 亚基
eEF	eukaryotic Elongation Factor	真核翻译延伸因子
GO	Gene Ontology	基因本体论
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
ATP	Adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
GTP	Guanosine triphosphate	鸟苷三磷酸
ETC	Electron transport chain	电子传递链
Int	Integration site	插入位点
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
rRNA	Ribosomal RNA	核糖体 RNA
CAFs	cancer-associated fibroblasts	癌症相关纤维母细胞
Warburg effect		瓦伯格效应
OXPHOS	Mitochondrial Oxidative Phosphorylation	线粒体氧化磷酸化
TCA		三羧酸循环
NAC	N-Acetyl Cysteine	N-乙酰半胱氨酸
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	非小细胞肺癌
PCI	Proteasome ,COP9 and Translation initiation factor 3	
P53		分子量为 53KDa 的抑癌基因
C-Myc		致癌基因
GBM	Glioblastoma	恶性胶质瘤
HIFs	hypoxia-inducible factors	缺氧诱导因子
ROS	Reactive Oxygen Stress	氧化应激
UTR	5' or 3' untranslated region	非转译序列
YES	Yeast Extract-Sucrose	蔗糖酵母提取物
EMM	Edinburgh minimal medium	爱丁堡基础培养基
nanoCAGE	nano-cap analysis of gene expression	小规模转录组分析

1 前言

1.1 概述 mRNA 的翻译过程和 eIF3 在翻译过程中的作用

蛋白质合成是基因表达的重要一步，因为它在建立细胞蛋白水平和定义细胞分化特征中起关键作用。蛋白质合成与其他代谢途径紧密结合，影响转录，蛋白质转换，神经细胞的早期发育和功能成熟等。蛋白质合成过程不仅需要足够的物质作为基础如各种酶，激酶，蛋白，氨基酸还需要大量的 ATP 和 GTP 作为能量储备。为了维持细胞稳态，必须调节蛋白质合成的总体速率，还需特别注意什么时候应该合成新的蛋白质，氨基酸和能量供应是否可以满足这些新蛋白合成的需要^[1]。蛋白质内稳态失衡可能导致神经系统和各种疾病状态，如糖尿病和癌症。

许多疾病的发生是由于合成特定活性蛋白质减少或者合成的蛋白质没有了原先的活力。这些疾病通常涉及编码蛋白质的基因的突变，导致蛋白质水平或活性的改变。这一般由两种原因引起：一是直接导致人类疾病的起始密码子或其周围的碱基发生了突变^[2]。在这种情况下，蛋白质合成的整个过程是正常的，只有突变的基因产物受到影响，即基因突变后合成的蛋白已经不是原先的蛋白了。第二种是，疾病状态是由于翻译装置本身的缺陷引起的。因为蛋白质合成对于细胞的健康至关重要，在早期发育过程中尤其重要。一般蛋白质合成中任何一部的重大缺陷都会影响合成的蛋白质的平衡，最终结果将是胚胎致死的，在出生后的人体中不可见。然而，翻译设备中的微妙缺陷可能发生并呈现在成年人身上。例如，其中一个起始因子 eIF2B 的一点点变化就足以导致一种蛋白质消失的神经疾病发生^[3]。

蛋白质的生物合成是指将 mRNA 中的遗传信息转译成蛋白分子中氨基酸排列顺序的过程，也称作转译或翻译。蛋白质的合成不仅需要 mRNA 作为合成蛋白质的模板，还需要 tRNA 作为氨基酸的“搬运工”，以及核糖体作为氨基酸相互缩合肽链的“装配机”。蛋白质的合成可以分为四个阶段：起始，延伸，终止和核糖体再循环。在真核生物中，蛋白质的合成与 mRNA 的转录过程在时间和空间上是分开的。真核细胞中传统的翻译过程是：核糖体小亚基在翻译起始因子 eIF2 α ，eIF3 和 eIF4s 的帮助下，首先结合在 mRNA 的 5'-帽子上形成复合物，该

复合物一起向 3'端移动直到启动子 AUG 序列被 tRNA^{Met} 上的反密码子识别, 然后翻译起始因子解离, 核糖体大亚基进入, 翻译起始复合物随之形成: tRNA 携带第二个密码子对应的氨基酸进入翻译起始复合物, 同时 GTP 水解供能, 使翻译起始复合物沿着 mRNA 5'→3'的方向移动下一个密码子的距离; 当核糖体移动遇到终止密码子的时候, 翻译在各种释放因子的协助下停止翻译; 解离的大小核糖体亚基将重新进入下个翻译循环。

在真核生物中, eIF3 由 13 个亚基组成, 是分子量最大, 结构最复杂的一个翻译起始因子。eIF3 将协助核糖体小亚基招募 mRNA 和识别起始密码子。eIF3 在细胞增殖, 分化和转移方面均发挥着重要的作用。早在 20 年前, 人们发现 eIF3 的功能与很多种疾病的发生和治疗有着密切的关系, 与癌症更是有着千丝万缕的联系。

1.1.1 翻译起始

通过 mRNA 翻译合成蛋白质主导着细胞内总蛋白质的水平。翻译起始被认为是蛋白质合成的限速步骤。在真核生物的翻译起始过程中, 有着众多的翻译起始因子 (eIFs)。eIF3 是最复杂的一个, 在哺乳动物中由 13 个亚基组成, 在 fission yeast *S. pombe* 中由 11 个亚基组成。eIF3 与 40s 核糖体结合在一起搭建一个招募其他翻译起始因子和 mRNA 的平台, 然后形成 43S 复合物一起沿着 mRNA 5'→3' 方向移动扫描, 直到识别 AUG 启动子^[4]。但是 eIF3 是如何起作用的, 机制还尚不清楚?

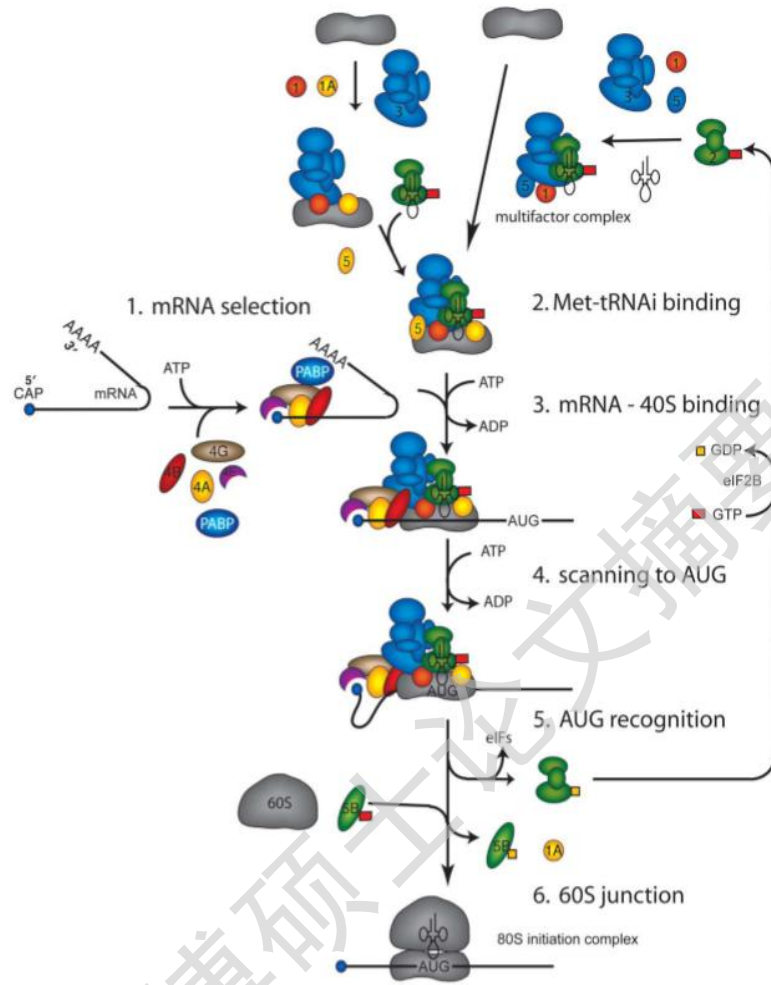


图 1: 翻译起始过程

Figure 1: Overview of translation initiation

This diagram summarizes the processes of mRNA selection, Met-tRNAi binding, 40S ribosomal subunit binding, scanning, start codon recognition and 60S joining, including involved protein factors. Initiation factors are shown as circular figures and identified by numbers within the shapes. Figure adapted from J.W.B. Hershey. Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. Braz J Med Biol Res 2010; 43: 920-930.

翻译起始一般有两种途径，一条是依赖 5'-末端的 m7G 帽子结构的，一条是不依赖的。在依赖 5'-末端的 m7G 帽子结构的蛋白翻译起始扫描过程涉及到四步：Met-tRNAi-40S 核糖体复合物与 mRNA 的 5'-末端区域的结合，沿着 mRNA 的 5'至 3'扫描，起始密码子 AUG 的识别，与 60S 亚基的结合形成 80S 起始复合物。由此形成的 80S 起始复合体能够进入蛋白质合成的下一个阶段：延伸。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库